

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年8月7日 (07.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/064462 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/435, A61K 38/22, 47/34, 47/48, A61P 19/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/01067
- (22) 国際出願日: 2003年2月3日 (03.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-26194 2002年2月1日 (01.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関森 泰男 (SEKIMORI, Yasuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 中村 輝郎 (NAKAMURA, Teruo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 清水 勝 (SHIMIZU, Masaru) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PEG-BINDING PTH OR PEG-BINDING PTH DERIVATIVE

(54) 発明の名称: PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体

(57) Abstract: It is intended to provide PTH or a PTH derivative showing an improved bioavailability and little side effects without worsening the PTH activity. By binding PEG to PTH or a PTH derivative, the bioavailability can be improved and side effects can be relieved while sustaining the PTH activity.

(57) 要約:

本発明の目的は、PTH活性を損なうことなくバイオアベイラビリティを高め、副作用の少ないPTH又はPTH誘導体を提供することである。PTH又はPTH誘導体にPEGを結合させることにより、PTH活性を保持しつつバイオアベイラビリティが増し、副作用も軽減される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/064462 A1

明細書

PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体

技術分野

- 5 本発明は、ポリエチレングリコール（PEG）を結合させたPEG結合副甲状腺ホルモン（PTH）又はPEG結合PTH誘導体、これらを含むPEG結合PTH組成物、これらを有効成分として含むPTH製剤、及びこれらの製造方法に関するものである。

10 背景技術

- 副甲状腺ホルモン（PTH）は、主に副甲状腺から分泌され、血中カルシウム濃度を制御するホルモン（Kronenberg, H.M. et al., Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp185-201, 1993）であり、骨代謝における重要なホルモンの一つとして知られている。血中カルシウム濃度が低下すると副甲状腺よりPTHが分泌される。PTHは腎臓でカルシウムの再吸収を促進し、25ビタミンD-1 α 水酸化酵素を誘導してビタミンDを活性型に変換する。また、PTHはこの活性化型ビタミンDを介して腸管からのカルシウム吸収を促進する。骨では骨芽細胞に作用して骨吸収を促進する。

- 20 副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）は、141個のアミノ酸で構成されており、腫瘍随伴性液性高カルシウム血症（Humoral hypercalcemia malignancy : HHM）の主な原因物質として発見された（Suva, L.J. et al., Science, 21: 893-896, 1987）。

- PTH及びPTHrPはPTH1受容体に作用することが知られている（Juppner, H. et al., Science 254: 1024-1026, 1991）。PTH1受容体はPTH及びPTHrPと同程度の結合性で結合し、細胞内にPKAのシグナルを上昇させるとともに、細胞内カルシウム濃度を上昇させてPLCのシグナルを活性化する（Abou-Samra, A. B. et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2732-2736, 1992; Bringhurst, F. R. et al., Endocrinology 132: 2090-2098, 1993）。

P T Hが骨のリモデリングにおける必須の全身性因子の一つであることは周知である。*in vivo* におけるP T Hの間歇的注射は卵巣摘出（O V X）ラット（Hock 等、1988；Liu 等、1991；Ibbotson、1992）又は健常ラット（Hock 及び Gera、1992；Dobing、1995）における骨質量の増大をもたらす。したがって、骨形成刺激は *in vivo* におけるP T Hの拍動性分泌の生理学的役割の一つと見なされている。実際、臨床においては、P T H（1－84）とP T H（1－34）は共に他の薬剤に比較して強力な骨形成促進作用を示すことが報告されており、P T H（1－34）の皮下投与は、腰椎と大腿骨頸部の骨折率を大幅に抑制した（Rittmaster, R. S. et al., J Clin Endocrinol Metab, 85: 2129-2134, 2000; Neer, R. M. et al., New Engl J Med 19: 1434-1441, 2001）。

これとは反対に、P T Hの持続的注入を受けた副甲状腺摘出（P T X）ラット（Kitazawa 等、1991）又は健常犬（Malluche 等、1982）の骨形態計測は、骨形成と骨吸収の同時的増大を示したが、骨質量の正味の増大を示さなかった。これらのことから、P T Hの持続投与は骨粗鬆症の治療には適しておらず、P T Hを間歇投与して速やかに血中から消失することこそ重要であると考えられてきた。

P T Hの副作用としては、血中カルシウム濃度上昇作用がある。正常ラットではP T H皮下間歇投与で血中カルシウム濃度の上昇をほとんど認めないが（Fox, J. et al., Bone, 21: 163-169, 1997）、P T Hをヒヨコに投与すると低用量でカルシウム濃度上昇作用が認められる（Parson, J. A. et al., Endocrinology, 92: 454-462, 1973）。また、甲状腺、副甲状腺摘出（T P T X）ラット及びP T Xラットに投与してもカルシウム濃度上昇作用が認められる（Horiuchi, N. et al., Am J Physiol, 244: E589-595, 1983; Ibrahim, M. M. et al., Calcif Tissue Int 34: 553-557, 1982）。臨床では、20～40 μ g のh P T H（1－34）を単回皮下投与すると投与後4～6時間に一過性の血中カルシウム濃度上昇が認められる（Lindsay, R. et al., J Clin Endocrinol Metab, 77: 1535-1539, 1993, Neer, R. M. et al., New Engl J Med 19: 1434-1441, 2001）。以上のことから、正常のげっ歯類ではP T Hによる血中カルシウム濃度上昇作用は弱い、臨床応用において

はPTHによる血中カルシウム濃度上昇作用は強いことが予想される。

- PTHのもう一つの副作用は血圧低下作用であり、PTH (1-34) はラット及びイヌで血圧低下作用を引き起こすことが報告されている (Pang, P. K. et al., Proc Natl Acad Sci, 77: 675-678, 1980)。ラットにおいては、PTHアナログの血圧低下作用も調べられており、PTH (1-34) は皮下投与で強い血圧低下作用を示す (Whitfield, J. F. et al., Calcif Tissue Int, 60: 302-308, 1997)。
- 臨床応用においてもPTH (1-34) の静脈内投与では血圧低下作用が認められることが報告されており、また、PTH投与後に一過性の頭痛が報告されている (Igarashi, T. et al., Pharmatherapeutica, 3: 79-85, 1982)。
- PTH (1-34) の臨床試験では、40 μ g の用量で投与した場合、副作用として嘔気や頭痛が統計上有意に出現しており、20 μ g の用量ではプラセボ群と同程度の出現頻度であったことから、20 μ g の用量が临床上使用可能な用量であると判断されている (Neer, R. M. et al., New Engl J Med 19: 1434-1441, 2001)。
- 抗がん剤の場合は副作用上容認できない用量の1段下の用量を臨床投与量とすることはガイドラインでも容認されている。しかしながら、一般に、慢性疾患においては長期に渡って安全に治療を継続できることが重要であることから、副作用上容認できない用量と臨床投与量とは十分に余裕をもって乖離していることが望まれている。従って、PTH投与に関しては、今だ十分に临床上の要請に対応できているとはいえず、更なる改善が求められている。
- 一般に、薬剤を皮下投与した場合は、静脈内投与した場合に比べてバイオアベイラビリティ (BA) が低い。さらに、PTHは皮下に投与すると速やかに吸収され代謝されるという性質を有する (Fox, J. et al., Bone, 21: 163-169, 1997)。
- PTH (1-34) とプロテアーゼ阻害剤を混ぜてヒヨコに皮下投与すると血中カルシウム濃度上昇作用が増加することから、PTHは皮下でプロテアーゼによる分解を受けることが示唆されている (Parson, J. A. et al., Br J Pharmac, 66: 25-32, 1979)。
- また、PTH (1-34) の代謝部位は主に肝臓と腎臓であることも報告されている (Martin, K. et al., J Clin Invest, 58: 781-788, 1976; Martin K. J. et al., J Clin Invest, 60: 808-814, 1977)。

WO 96/35447号は、持続投与用の注入液をパッチ又はイオン導入

法で経皮的に持続投与することにより活性成分の放出時間を2～6時間に
するPTHの製剤投与形態について開示している。しかしながら、この投与形
態には、経皮投与であるために以下のような問題があった。すなわち、パッ
チでは簡便な反面、経皮吸収のための添加剤や粘着剤へのアレルギーやかぶ
5 れが起き易いため患者の負担が大きく、また、イオン導入法では装置が大が
かりである。一般に、薬剤を皮下投与すると静脈内投与に比べてBAが低い。
経皮吸収では、更に皮膚を通過する必要があるため、PTHの体内への吸収
率が極めて低くなることが予測され、一定の投与量に対して個体差や部位に
10 なる吸収量のばらつきが大きくなり、薬効と副作用のコントロールが難しく
なると考えられる。その上、WO 96/35447号には、高カルシウム血症
や血圧低下については何ら記載されてはおらず、この投与形態には副作用
の軽減効果はないものと考えられる。

WO 01/81415では、PTH/PTHrPの活性調節ドメインに抗体
のFcドメインを結合させることにより徐放性を付与している。その際、
15 骨吸収抑制剤を同時投与することによって高カルシウム血症の発症を抑制し
ている。しかし、単剤投与では正常マウスにおいてさえも強い血中カルシウ
ム濃度上昇作用が認められていることから、臨床応用における血中カルシウ
ム濃度上昇作用は非常に強いことが予想され、临床上の有用性はないものと
考えられる。

20 さらに実験動物と異なり、実際の骨粗鬆症患者においては、Fcドメイン
を結合させたPTHに対する反応性と骨吸収の程度には個人差が出ることが
容易に考えられる。骨吸収抑制剤の併用についても、その反応性に個人差が
でる可能性があり、両薬物を適切な投与量および投与間隔で、安全に同時投
与することは極めて困難であることは容易に予測できる。また、Fcドメイ
25 ンとのキメラタンパク質を用いると、特に長期間継続的に投与する必要があ
る骨粗鬆症患者において、抗原性によるアナフィラキシー反応やPTHに対
する中和抗体出現が危惧される。

一方、特開平7-196925号公報は、タンパク質を水溶性ポリマーで修飾
することにより、タンパク質に望ましい性質を付与する方法及び組成物を開示し

ている。具体的には、タンパク質上のアルデヒド基、ケトン基、ラクツール、活性化されたカルボン酸又は活性化されたカルボン酸誘導体と、ヒドラゾン結合若しくはオキシム結合を形成可能な水溶性ポリマー又はオキシルアミン水溶性ポリマーの誘導体（例えば、PEG）とを共有結合により結合させることにより修飾されたタンパク質について記載している。これらの修飾タンパク質には水溶液中の溶解度の上昇、貯蔵期間中の安定性の増加、免疫原性の減少、酵素的分解に対する抵抗性の増加、より広範な種類の薬物投与系との適合性、及び *in vivo* 半減期の増加といった性質が付与される。この公報によれば、水溶性高分子、例えばPEGは、タンパク質又は糖タンパク質を構成するアミノ酸又は糖の種々の遊離基に結合して、1分子のタンパク質に対して6～34個のPEG（分子量2,000～12,000）をカップリングさせており、これによって初めて上述の新たな性質が付与されている。

しかしながら、このように多数のPEGを結合させたPEG修飾タンパク質又は糖タンパク質ではPEGの結合位置、結合個数を制御することが難しく、均一なPEG修飾タンパク質又は糖タンパク質を得ることは困難である。したがって、この方法によって得られるPEG修飾タンパク質又は糖タンパク質を医薬品として製剤化することには問題があった。

また、近年PEG修飾タンパク質医薬品として海外で市販されたインターフェロン α 2b製剤「PEGINTRON」（シュeringプラウ社）は、分子量12,000のPEGを結合させたものであるのに対し、後に市販された「PEGASYS」（ホフマン・ラ・ロシュ社）は、薬効持続性の延長を期待して、より長い分子量40,000のPEGを結合させたインターフェロン α 2a製剤である。このようにPEG修飾タンパク質医薬品の開発においては、薬効を持続させるにはPEG鎖長は長いほど良いと考えられている。

即ち、従来のPTH製剤では、皮下投与や経皮、経粘膜投与におけるBAが極めて低いため、薬効と副作用のコントロールが難しいという問題があり、PTHのBA改善および薬効増強と副作用のコントロールができる技術の開発が望まれていた。

発明の開示

上記のように、PTHに徐放性を付与する試みや免疫原性および安定性を改善する試みはいくつか報告されている。しかしながら、これらには、煩雑な方法が必要であったり、副作用が増強される等の問題があった。

- 5 そこで、本発明者等は、上記問題を解決するため種々の検討を行った。その結果、驚くべきことに、PTHにポリエチレングリコール（PEG）を結合させると、PEGを結合していないPTHと比較してPTHの血中濃度が持続する一方、皮下投与で顕著に高いBAを実現し、血圧低下を大幅に軽減することを見出した。更に本発明では、PTHに結合させるPEG鎖長を、通常では薬効増強にはむしろ短かいと判断される範囲で選択することで、血中カルシウム濃度の急激な上昇もないことを見出し、薬効と副作用を制御することが可能であることを示した。
- 10 本発明はこれらの知見に基づき完成したものである。

したがって、本発明は、皮下投与に際して高いBAが得られ、副作用の少ないPTHを提供することを目的とする。

- 15 すなわち、本発明は、PEGを結合させたPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を提供する。

また、本発明は、上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を含むPEG結合PTH組成物を提供する。

- 20 更に、本発明は、薬効を保つのに有効な量の上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を有効成分として含有するPTH製剤を提供する。

また、本発明は、PTH又はPTH誘導体にシステイン残基を導入した[Cys]-PTH誘導体を提供する。

- 25 更に、本発明は、PTH又はPTH誘導体中のアミノ基とPEG誘導体とを縮合させるか、またはアミノ基にPEG誘導体を付加させることを包含する、上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体の製造方法を提供する。

また、本発明は、PTH又はPTH誘導体に導入したPEG結合部位に、PEGを結合させることを包含する、上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体の製造方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1中、(a)は5k及び20k PEG-PTHについて PhastGel Homogeneous 20 を用いて SDS-PAGEを行い、銀染色した電気泳動写真である。(b)は、2k PEG-PTHについて PhastGel High Density を用いて SDS-PAGEを行い、

5 銀染色した電気泳動写真である。

図2は、5k PEG-PTHについて PhastGel Homogeneous 20 を用いて SDS-PAGEを行い、銀染色した電気泳動写真である。

図3は、静脈内投与による PTH (1-34) 及び PEG-PTH (1-34) の血漿中濃度推移を示すグラフである。

10 図4は、皮下投与による PTH (1-34) 及び PEG-PTH (1-34) の血漿中濃度推移を示すグラフである。

図5は、正常マウスに hPTH (1-34)、5k 及び 2k PEG-PTH (1-34) を投与した場合の補正血中イオン化カルシウム濃度の経時変化を示すグラフである。

図6は、ラットに PTH を投与後 20 分までの血圧の経時変化を示すグラフである。
15

図7は、PTH投与前の平均血圧値と、投与後最大血圧低下を示した値との差を平均値±標準誤差として示したグラフである。

図8は、卵巣摘出ラットにおける、hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35) 及び 2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) 投与による腰椎骨密度増加作用 (a) 及び大腿骨骨
20 密度増加作用 (b) を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、PEGを結合させたPEG結合副甲状腺ホルモン(PTH)又はPEG結合PTH誘導体に関するものである。

25 本発明におけるPTHは、天然型のPTH、遺伝子工学的手法で製造された組換えPTH、化学的に合成されたPTHを包含し、例として、84アミノ酸残基よりなるヒトPTH(ヒトPTH(1-84))、特に遺伝子工学的手法で製造された組換えヒトPTH(1-84)が挙げられる。またPT

H誘導体とは、前記のPTHの部分ペプチドや、PTHそのものあるいはその部分ペプチドの構成アミノ酸を一部他のアミノ酸に置換したもの、PTHそのものあるいはその部分ペプチドの構成アミノ酸の一部を欠失したもの、およびPTHそのものあるいはその部分ペプチドに1種以上のアミノ酸を付加したペプチドなどで、天然由来のPTHと同様の生物学的活性を有するものを意味する。アミノ酸の一部を置換、欠失及び／又は付加したものと、部位特異的突然変異誘発法等の周知の方法により置換、欠失及び／又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたものを意味する。PTHの部分ペプチドとしては、例えばヒトPTH(1-9)、ヒトPTH(1-11)、ヒトPTH(1-14)、ヒトPTH(1-20)、ヒトPTH(1-28)、ヒトPTH(1-34)、ヒトPTH(1-35)、ヒトPTH(1-37)、ヒトPTH(1-38)、ヒトPTH(1-64)、ヒトPTH(35-84)、ウシPTH(1-34)などが挙げられる。PTH(1-34)とはPTHのN末端から34番目のアミノ酸までの34個のアミノ酸からなるPTHの部分ペプチドあるいはそのカルボキシ末端をアミノ化したもの(即ち、ヒトPTH(1-34)-NH₂)を示す。また、アミノ酸置換の例としては、8位の構成アミノ酸のロイシンやノルロイシンへの置換、18位の構成アミノ酸のロイシンやノルロイシンへの置換、34位の構成アミノ酸のチロシンへの置換などが挙げられる。

また、WO 2001/23521号、WO 2001/23427号、WO 2000/31266号、WO 2000/39278号、WO 01/81415号、Naoto Shimizu, J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 52, 49003-49012, 2001に記載されている誘導体も用いることができる。

また、PTH又はPTH誘導体として、システイン残基を導入したもの、すなわちPTH又はPTH誘導体の1又は複数のアミノ酸残基をシステイン残基に置換した、および／またはPTH又はPTH誘導体に1又は複数のシステイン残基を付加又は挿入した、[Cys]-PTH誘導体を用いることもできる。システイン残基を導入する部位は特に限定されないが、例えば、システイン残基

- は、N末端以外の部位に導入されており、例えば、9位～C末端、11位～C末端、14位～C末端、20位～C末端、あるいは28位～C末端に導入されており、特にC末端に導入されている。例えば、PTH(1-34)のC末端にシステイン残基を付加した[Cys³⁵]-PTH(1-35)を用いることができる。ここで例えば、9位～C末端へのシステイン残基の導入とは、9位～C末端のいずれかのアミノ酸残基のシステイン残基への置換、9位と10位との間～C末端から2番目のアミノ酸残基とC末端アミノ酸残基との間のいずれかへのシステイン残基の挿入、およびC末端アミノ酸残基へのシステイン残基の付加を意味する。
- 10 本発明に用いるPTH又はPTH誘導体の純度は必ずしも100%である必要はなく、これらのPTH又はPTH誘導体は実質的に純粋であればよい。本発明において「実質的に純粋」とは、少なくともHPLCにて単一ピークを示すように精製されたものであり、特にSDS-PAGE、キャピラリー電気泳動等の手法を組み合わせることで単一であることが確認されたものを意味する。かかるPTH
- 15 類は特開平6-87897号公報(米国特許第5,208,041号に対応)に記載された方法を用いて、あるいは、特表平4-505259号公報(WO90/14415号に対応)およびJ. Biol. Chem., 265, 15854, 1990に記載された方法又はそれらの改良法を用いても製造、確認することができる。
- 本発明において、活性エステルを片末端に有するPEG誘導体をPTH又はPTH誘導体に反応させることにより、PEGを結合させることができる。本発明
- 20 において使用されるPEG誘導体としては、片末端をメトキシ化したものが挙げられる。また、PTH又はPTH誘導体と結合させるために、メトキシ化されていない片末端に、アミノ基若しくはチオール基と縮合するかまたはこれらに付加可能な官能基を導入したPEG誘導体、例えばサクシンイミジル低級脂肪酸エステル化したPEG、アルデヒド化したPEG、ベンゾトリアゾールカーボネート化したPEG、グリシジルエーテル化したPEG、オキシカルボニルイミダゾール化したPEG、ニトロフェニルカーボネート化したPEG、イソシアネート化
- 25 したPEG、例えばメトキシPEG-サクシンイミジル低級脂肪酸エステル、特

にサクシンイミジル・プロピオン酸エステル化したメトキシPEG (mPEG-SPA) 又はサクシンイミジル・酪酸エステル化したメトキシPEG (mPEG-SBA) を使用することができる。これらPEG誘導体をタンパク質中のアミノ基に結合させる方法としては、米国特許第5,672,662号、WO96/11953号、WO94/13222号、Cristina, M. et al., Bioconjugate Chem, 6: 62-69, 1995、Charles, O. Beuchamp, et al., Anal Biochem, 131: 25-33, 1983、Steven, M. Chamow et al., Bioconjugate Chem, 5: 133-140, 1994に記載の方法などを用いることができる。

また、マレイミド化、ビニルスルホン化、オルソピリジルジスルフィド化、あるいはヨードアセトアミド化などしたPEG誘導体を使用することもできる。これらは、PTHの末端あるいはアミノ酸配列中にシステイン残基を付加するか又はシステイン残基で置換したPTH誘導体に、PEGを結合させるために用い、PEG結合部位を特定することができる。特定の位置にシステイン残基を付加するか又はシステイン残基で置換したタンパク質にPEGを結合させる方法としては、特表平4-504801号公報 (WO90/12874号に対応)、WO99/03887号、WO00/42175号公報に記載の方法を用いることができる。これらの方法によって得られる本発明のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体は、例えばPTH又はPTH誘導体1分子当たり1~4分子のPEGが結合している。モノ-メトキシPEG-PTH (mono-mPEG-PTH) は、PTH又はPTH誘導体1分子当たり、1分子のPEGが結合している。

例えば、[Cys³⁵]-PTH (1-35) のC末端にPEGを結合させると、アミノ基にPEGをランダムに結合させる場合に比べて、活性 (例えば *in vitro* cAMP産生能) がより高く、品質 (例えば品質規格) も均一性が高く、有用性が高い。PEGの結合位置をコントロールしない場合、PEGがN末端、又は13位、26位若しくは27位のLysに結合するものが多い。このように結合位置をコントロールしないで作製したPEG結合PTHなどでは、C末端に結合したものに比べて、*in vivo* 及び *in vitro* (PTH受容体を高発現していない細胞) の試験において活性がやや低下する傾向がある (データは示していない)。

修飾に使用されるPEGの分子量は、得られるPEG結合PTHなどに要求される薬効持続効果の程度と副作用の程度、及びPTH活性の低下の程度等により適宜変更することができるが、PEG1分子の分子量は、1kDa以上20kDa未満、好ましくは1kDa以上5kDa以下、さらに好ましくは2kDa以上5kDa以下、特に2kDaである。PEGは直鎖型だけでなく分枝型あるいは星型等でも使用可能である。

本発明において、PEGは、PTH又はPTH誘導体中の1又は複数箇所に結合しており、好ましくは1～4箇所に結合している。結合部位は特に限定されないが、例えば、PEGは、N末端以外の部位に結合しており、例えば、9位～C末端、11位～C末端、14位～C末端、20位～C末端、あるいは28位～C末端に結合しており、特にC末端に結合している。これまで、PTH(1-9)、PTH(1-11)、PTH(1-14)、PTH(1-20)にもPTH活性が確認されている(Luck, MD. et al., Mol. Endocrinol. 1999, 13, 670-680; Shimizu, M. et al., J. bio. Chem. 2000, 275, 21836-21843; Shimizu, M. et al., Biochemistry 2002, 41, 13224-13233)。また、PTH(1-27)はPTH(1-28)に比較し、活性が弱いことが知られている(Takasu, H. et al., Biochemistry, 38, 13453-13460, 1999)。したがって、28位～C末端にPEGが結合したPTHが好ましい。

PTH又はPTH誘導体にPEG結合部位を導入し、このPEG結合部位を介してPTHを結合させてもよい。PEG結合部位にはシステイン残基が含まれる。

PEG結合PTHなどの精製には、PEG/デキストラン2相分配、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを用いることができる。

実施例1において、分子量が2k、5k及び20kDaのPEGを結合させたPTH、即ち2k PEG-PTH、5k PEG-PTH及び20k PEG-PTHの調製例を示す。実施例2においては、これらのPEG結合PTHが、PTH活性の1つであるcAMP産生能を保持することを明らかにする。実施例3においては、これらのPEG結合PTHがPEGの分子量に応じた血中濃度推移を示すのみならず、BA

- がPEGを結合していないPTHに比べて著しく改善したことを明らかにする。
- また、実施例4で詳述するように、副作用として問題になる血中カルシウム濃度上昇作用は、2k 及び 5k PEG-PTH ではPEGを結合しないPTHと大きく変わることがないが、20k PEG-PTH では血中カルシウム濃度上昇作用が強く、
- 5 更に上昇した血中カルシウム濃度が長時間持続する傾向があり、5 kDa以下のPEGを結合させたPEG結合PTHは、WO 01 / 81415号のFcドメインを結合させたPTHに比べてより安全であることを明らかにする。また、5k PEG-PTH では、通常の骨量増加作用を有するPTHと若干異なる挙動を示すことも明らかにする。更に、実施例5で詳述するように、PTHの副作用の1
- 10 つである血圧低下作用について、5k PEG-PTH を用いて調べ、PEGを結合しないPTHに比べて血圧低下が非常に低いことを明らかにする。実施例6では、PEGの結合位置をコントロールして2 kDaのPEGを結合させたPTHが、骨密度増加作用を示すことを明らかにする。

- さらに、本発明は、上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を含む
- 15 するPEG結合PTH組成物、及び薬効を保つのに有効な量の上記PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を有効成分として含有するPTH製剤に関するものである。

- 本発明のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体、例えばモノメトキシPEG-PTHを用いることにより、高いBAによって薬効と副作用のコントロールが容易になり、かつ、PTH投与による血圧低下に起因する副作用が抑え
- 20 られ、また血中カルシウム濃度の過度の上昇もない、安全かつ効果的な骨粗鬆症治療が可能になる。したがって、PTHの長期投与が必要な患者が被る嘔気・頭痛等の副作用による肉体的及び精神的苦痛を軽減または解消し、患者の生活の質（QOL）の向上が可能になる。さらに苦痛が少なく効果的な治療法を提供すること
- 25 ことで患者の治療に対するコンプライアンスが向上し、骨粗鬆症に起因する骨折患者が減少して、老人医療のコスト抑制を可能にする。

PEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体は、例えば皮下注射では1日1回、あるいは週1～2回の投与が可能であり、例えば皮下注射では1日1回の投与量は、例えば成人の場合、1人当たり1～200 μ g、好ましくは5～100 μ

g、さらに好ましくは5～50 μ gとなることが予測される。

本発明によるPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体は、皮下注射、静脈内注射、経粘膜投与（例えば経肺、経鼻など）、経皮投与などの投与経路により患者へ投与することができる。

- 5 採用する投与方法にあわせて、溶液製剤、凍結乾燥製剤、プレフィルドシリンジ、無痛針あるいは無針型皮下投与製剤、イオントフォレシスあるいは皮内埋め込み型の徐放製剤（例えばマイクロカプセル、高分子ミセル、高分子を含むゲル化製剤、リポソームなど）などに製剤化することが可能である。本発明のPTH製剤は、従来のPTH又はPTH誘導体よりも安定な製剤を提供することができることから、従来のものよりも更に有用である。
- 10

実施例

以下の実験例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

15

実施例 1

(1) PEG-PTH の調製 (*in vitro* 活性試験およびBA試験用試料)

- 20 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に溶解させた 1 mg/mL hPTH (1-34) 溶液 2.16 mL、1.35 mL 及び 1.08 mL に、それぞれ mPEG 2k-SPA 21.1 mg、mPEG 5k-SPA 37.0 mg 及び mPEG 20k-SPA 106.1 mg をそれぞれ溶解し、室温下に2時間穏やかに振とうした。得られた溶液に、20 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) をそれぞれ 1.84 mL、0.7 mL 及び 3 mL 加え、陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。mPEG 5k-SPA とPTHを反応させた混合液は、陽イオン交換クロマトグラフィーに供する前に、20 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) で平衡化したPD-10に通して溶媒置換を行った。陽イオン交換クロマトグラフィーの条件を以下に示す。
- 25

カラム: Resource S、1 mL (Amersham Pharmacia Biotech)

移動相A: 20 mM 酢酸バッファー (pH 4.0)

移動相B: 20 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) / 1 M NaCl

溶出プログラム: 0～10分 (100%移動相A)

25分(90%移動相B)

25.5分(100%移動相B)

溶出速度: 2 mL/min.

1分子のPEGが結合した mono-2k PEG-PTH、mono-5k PEG-PTH 及び mono-20k
5 PEG-PTH 画分をそれぞれ分取し、セントリコンー 3、10 及び 30 で濃縮して、
それぞれ 445 µg、456 µg 及び 239 µg (hPTH (1-34) 相当量) 得た。得られた試
料のうち、5k PEG-PTH 及び 20k PEG-PTH については PhastGel Homogeneous 20
(図 1 a) を、2k PEG-PTH については PhastGel High Density (図 1 b) を用い
て SDS-PAGE を行い、銀染色した。図中、レーン M は分子量マー
10 (2512, 6214, 8159, 10700, 14404, 16949 Da) を、レーン P は未反応 PTH を、
レーン 1 は mono-20k PEG-PTH を、レーン 2 は陽イオン交換クロマトグラフィー
に供する前の 20k PEG-PTH 反応混合液を、レーン 3 は mono-5k PEG-PTH を、レー
ン 4 は陽イオン交換クロマトグラフィーに供する前の 5k PEG-PTH 反応混合液を、
レーン 5 は陽イオン交換クロマトグラフィーに供する前の 2k PEG-PTH 反応混合
15 液を、レーン 6 は mono-2k PEG-PTH を、レーン 7 は mono-及び di-2k PEG-PTH 混
合画分を、レーン 8 は di-2k PEG-PTH を表す。

(2) PEG-PTH の調製 (血圧低下抑制試験用試料)

20 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に溶解させた 1 mg/mL hPTH (1-34) 溶液
20 0.54 mL に、9.63 mg の mPEG 5k-SPA を溶解し、室温下に 2 時間穏やかに振とう
した。得られた溶液に、20 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) を 3.5 mL 加え、陽イ
オン交換クロマトグラフィーに供した。陽イオン交換クロマトグラフィーの条件
は上記 (1) の場合と同様である。1 分子の PEG を結合させた mono-5k PEG-
PTH 画分を分取し、セントリコンー 10 で濃縮して 194 µg (hPTH (1-34) 相当
25 量) を得た。得られた試料について PhastGel Homogeneous 20 を用いて SDS-
PAGE を行い、銀染色した。結果を図 2 に示す。図中、レーン M は分子量マー
カーを、レーン P は未反応 PTH を、レーン 1 は陽イオン交換クロマトグラフィー
に供する前の 5k PEG-PTH 反応混合液を、レーン 2 は mono-5k PEG-PTH を、レ
ーン 3 は di-5k PEG-PTH を、レーン 4 は tri-5k PEG-PTH を表す。

(3) mPEG 2k-[Cys³⁵]-PTH (1-35) の調製

70.5 mg の[Cys³⁵]-PTH (1-35) を、33.488 mL の 100 mM クエン酸ナトリウム/10 mM EDTA (pH 4.0) 溶液に溶解した。この溶液に 1.763 mL の 20 mM
5 トリス (2-カルボキシエチルホスフィン) 塩酸塩溶液を加えた。さらに、
1.102 g の mPEG 2k-MAL (2 kDa PEG-マレイミド) を加えて溶解し、室
温下に 4 時間静置した。3.525 mL の 220 mM ジチオスレイトールを加えて反応
を停止させた後、PD-10 カラムを用いて溶媒を 20 mM 酢酸ナトリウム
(pH 4.0) に置換した。得られた溶液を 8 回に分けてイオン交換クロマトグラ
10 フィー (条件は以下に示す。) に供し、それぞれ mPEG 2k-[Cys³⁵]-PTH (1-35)
溶出画分を分取した。

カラム: Resource S, 6 mL

溶出液: 20 mM 酢酸ナトリウム

濃度勾配: 0~1 M NaCl, 10 分

15 検出器: UV、吸光度 280 nm

分取した画分を濃縮し、280 nm における吸光度から[Cys³⁵]-PTH (1-35) 換算
濃度を算出した。得られた mPEG 2k-[Cys³⁵]-PTH (1-35) は、[Cys³⁵]-PTH (1-
35) 換算で 48.5 mg (収率 68.8%) であった。

20 実施例 2

PEG-PTH 分子の *in vitro* における cAMP 産生能の測定

各 PEG-PTH について、PTH の骨増加作用の指標となる cAMP 産生能を以
下の方法で測定した。ブタ腎臓由来の細胞である LLC-PK1 細胞にヒト PTH
H1 受容体を遺伝子的に過剰発現させた細胞である HKRK-B7 細胞及び HK
25 RK-B64 細胞 (1 細胞あたりヒト PTH1 受容体をそれぞれ約 1×10^6 個
及び 9×10^4 個発現)、並びに EW29 (1 細胞あたりラット PTH1 受容体
を約 1.9×10^5 個発現) (高須ら、J. Bone. Miner. Res. 14: 11-20,
1999) を、10% FBS、1% ペニシリン及び 1% ストレプトマイシン含有 DMEM で
培養した。これらの細胞を 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 1×10^5 細胞蒔き

こみ、一晩放置した。次の日に、200 μ L の結合バッファー (50 mM Tris-HCl / 100 mM NaCl / 5 mM KCl / 2 mM CaCl_2 / 5% 非動化ウマ血清 / 0.5% 非動化ウシ血清、pH 7.7) で細胞を一度洗浄し、氷上にて 100 μ L の cAMP アッセイバッファー (DMEM / 2 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン / 1 mg/mL ウシ血清アルブミン / 35 mM HEPES-NaOH、pH 7.4) を加えた。次に結合バッファーで各濃度に調整した hPTH (1-34) 及び実施例 1 で調製した PEG-PTH をそれぞれ 50 μ L 加え、細胞を 37℃ の水浴に載せて 20 分間放置した。反応液を除去し、パウダー状にしたドライアイス上にプレートを載せて細胞を凍結させた後、プレートをドライアイス上からはずし、50 μ L の 50 mM HCl を加えて細胞を融解させ、再度ドライアイス上に載せて細胞を凍結させた。細胞中の cAMP 量は、市販の EIA キット (Biotrak cAMP EIA system、アマシャム社製) を用いて測定した。

hPTH (1-34) 及び各 PEG-PTH (1-34) 分子の、HKRK-B7 細胞内における cAMP 産生能を表 1 に示す。hPTH (1-34) の EC_{50} 値は 1.5 nM であったのに対して、2k PEG-hPTH (1-34) 及び 5k PEG-hPTH (1-34) の EC_{50} 値はそれぞれ 0.7 nM 及び 1.6 nM であった。このことから、5 kDa 以下の PEG を PTH に結合させても cAMP 産生能にはほとんど影響がないことが示された。一方、20k PEG-hPTH (1-34) の EC_{50} 値は 11 nM であり、cAMP 産生能の低下が認められたが、活性を保持していることが示された。

20

表 1 PEG-hPTH (1-34) の cAMP 産生能

ペプチド	EC_{50} (nM)	最大 cAMP 応答 (pmol/well)
hPTH (1-34)	1.5	121.3
2k PEG-hPTH (1-34)	0.7	141.2
5k PEG-hPTH (1-34)	1.6	136.0
20k PEG-hPTH (1-34)	11.0	122.3

次に、[Cys³⁵]-hPTH (1-35) 及び各 PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) 分子の細胞内 cAMP 産生能を表 2 に示す。ヒト PTH 1 受容体を高発現している HKRK-B 7 細胞においては (1)、hPTH (1-34) の EC₅₀ 値は 0.4 nM であったのに対して、2k 及び 5k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.5 nM 及び 0.9 nM であり、cAMP 産生能はほとんど低下しなかった。一方、20k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値は 2.7 nM であり、cAMP 産生能の低下が認められた。

ヒト PTH 1 受容体の発現量が少ない HKRK-B 6 4 細胞においては (2)、hPTH (1-34) の EC₅₀ 値は 0.3 nM であったのに対して、2k 及び 5k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.6 nM 及び 1.0 nM であり、cAMP 産生能はあまり低下しなかった。一方、20k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値は 8.0 nM であり、cAMP 産生能の低下が認められた。

ラット PTH 1 受容体を発現している EW 2 9 細胞においても同様の傾向が認められた (3)。hPTH (1-34) の EC₅₀ 値は 0.2 nM であったのに対して、2k 及び 5k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値はそれぞれ 2.2 nM 及び 3.5 nM であり、cAMP 産生能の低下は 10～20 分の 1 程度であった。一方、20k PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の EC₅₀ 値は 9.1 nM であり、cAMP 産生能の大幅な低下が認められた。

このことから、5 kDa 以下の PEG を PTH に結合させる場合は、cAMP 産生能はある程度保持されるが、それ以上の分子量の PEG を結合させると cAMP 産生能が顕著に低下することが認められた。

表2 PEG-[Cys³⁵]-hPTH (1-35) の cAMP 産生能

(1) HKRK-B7細胞

ペプチド	n	EC ₅₀ (nM)	最大cAMP応答 (pmol/well)
hPTH (1-34)	3	0.4 ± 0.1	128.2 ± 14.3
[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.7 ± 0.3	130.7 ± 15.2
2k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.5 ± 0.1	109.3 ± 10.1
5k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.9 ± 0.4	122.7 ± 11.5
20k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	2	2.7 ± 0.7	131.1 ± 7.5

5 (2) HKRK-B6細胞

ペプチド	n	EC ₅₀ (nM)	最大cAMP応答 (pmol/well)
hPTH (1-34)	3	0.3 ± 0.03	72.2 ± 18.8
[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.3 ± 0.04	70.6 ± 19.5
2k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.6 ± 0.4	65.4 ± 19.4
5k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	1.0 ± 0.6	66.6 ± 17.4
20k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	2	8.0 ± 7.4	79.6 ± 14.6

(3) EW29細胞

ペプチド	n	EC ₅₀ (nM)	最大cAMP応答 (pmol/well)
hPTH (1-34)	3	0.2 ± 0.01	57.0 ± 4.2
[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	0.3 ± 0.06	50.4 ± 9.7
2k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	2.2 ± 1.6	52.2 ± 12.3
5k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	3	3.5 ± 1.2	52.5 ± 14.1
20k PEG-[Cys ³⁵]-hPTH (1-35)	2	9.1 ± 0.9	59.4 ± 12.9

実施例 3

PEG-PTH (1-34) のラットにおけるバイオアベイラビリティ

実施例 1 で作製したモノ PEG-PTH (1-34) を用いて、ラットにおけるバイオアベイラビリティを測定した。

- 5 各サンプルは、100 mmol/L NaCl 及び 0.05 vol% Tween 20 を含有する 25 mmol/L クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて 80 µg/mL となるように希釈し、投与溶液とした。6 週齢の雄性 SD 系ラット (日本クレア社製) を実験に供した。静脈内投与は、大腿動脈、大腿静脈にポリエチレンチューブ (SP-3 1、夏目製作所製) を挿入したラットを用いて行った。投与溶液を 1 mL/kg の
- 10 投与用量で大腿静脈に挿入したポリエチレンチューブを介して投与し、投与前、並びに投与後 5、15、30、45 分、及び 1、2、4、6、8、24 時間に大腿動脈に挿入したポリエチレンチューブより血液を採取した。皮下投与は、大腿動脈にポリエチレンチューブを挿入したラットを用いて行った。投与溶液を 1 mL/kg の投与用量でラットの頸背部皮下に投与し、静脈内投与の場合と同様に
- 15 血液を採取した。血液を遠心分離して得られた血漿は、PTH (1-34) または PEG-PTH (1-34) の濃度を測定するまで -40℃ で保管した。

- PTH (1-34) または PEG-PTH (1-34) の濃度測定は、Rat PTH IRMA Kit (Immutopics 社製) を用いて RIA 法により行った。放射活性は、コブラ クワンタム 5005 型ガンマーカウンター (パッカード社製) を用いて測定した。血
- 20 漿中の PTH (1-34) または PEG-PTH (1-34) の濃度は、PTH (1-34) または PEG-PTH (1-34) を用いて作成した検量線を用いて算出した。得られた血漿中の PTH (1-34) または PEG-PTH (1-34) の濃度の時間推移を Winnonlin (Ver. 2.1, Scientific Consulting Inc.) を用いて解析し (図 3 : 静脈内投与、及び図 4 : 皮下投与)、薬物速度論のパラメータとして最高血漿中濃度への到達
- 25 時間 (Tmax)、最高血漿中濃度 (Cmax)、血漿中濃度曲線下面積 (AUC)、血漿中半減期 (t1/2)、全身クリアランス (Cltotal)、平均体内滞留時間 (MRT)、バイオアベイラビリティ (BA) を算出した。結果を表 3 (静脈内投与) 及び表 4 (皮下投与) に示す。

皮下投与時の BA は、PTH (1-34) で約 13.6% であったのに対し、2 kDa、

または5 kDaのPEGを結合させることにより、それぞれ約56.1%、71.0%に上昇し、PEGを結合させることによって、10数%であったPTHのBAが50%を超えることが可能になった。

- このことから、結合させるPEGの分子量を変えることにより、血中への吸収
5 時間、血中滞留性、およびバイオアベイラビリティを制御することが可能であると考えられた。

表3 PTH (1-34) 及び PEG-PTH (1-34) の薬物速度論的パラメータ
(静脈内投与)

	AUC (pg · h/mL)	t1/2 (h)	MRT (h)	Cl _{total} (mL/h/kg)
PTH (1-34)	21659	0.231	0.211	3700.3
2k PEG-PTH (1-34)	95781	1.128	0.465	841.7
5k PEG-PTH (1-34)	178547	5.706	2.578	449.4

10

表4 PTH (1-34) 及び PEG-PTH (1-34) の薬物速度論的パラメータ
(皮下投与)

	T _{max} (h)	C _{max} (h)	AUC (pg · h/mL)	t 1/2 (h)	MRT (h)	BA (%)
PTH (1-34)	0.194	5551	2944	0.349	0.546	13.6
2k PEG-PTH (1-34)	0.300	35419	53780	1.231	1.684	56.1
5k PEG-PTH (1-34)	0.813	36305	126793	6.758	5.706	71.0
20k PEG-PTH (1-34)	7.000	127263	2693945	11.346	18.93	

15

実施例 4

PEG-PTH の正常マウスにおける血中カルシウム濃度上昇作用

(1) PEG-PTH (1-34)

正常マウスにおける PEG-PTH (1-34) の血中カルシウム濃度上昇作用の有無
5 について、以下の方法で検討した。hPTH (1-34) を、25 mmol/L リン酸-クエン酸緩衝液/100 mmol/L NaCl/0.05% Tween 80 溶液 (pH 5.0) を用いて希釈し、100、30、10 nmol/mL に調製した。2k 及び 5k PEG-PTH (1-34) も同様に 30 nmol/mL (PTH 相当量) に調製し、投与直前まで氷冷放置した。

5 週齢の雄 B D F 1 マウス (日本チャールス・リバー株式会社) の体重を測定
10 した。薬剤投与直前に眼窩よりヘパリンコートしたキャピラリーに血液を採取し、薬剤投与前の血中イオン化カルシウム濃度及び pH を、 Ca^{2+} /pH 測定機 (348 型/バイエルメディカル) にて測定し、pH 7.4 の時の補正イオン化カルシウム濃度を得た。緩衝液、並びに 500、150 及び 50 nmol/kg の hPTH (1-34) は一群 6 匹ずつ、150 nmol/kg の 5k PEG-PTH (1-34) は 3 匹、150 nmol/kg
15 の 2k PEG-PTH (1-34) は 1 匹に、各薬剤 5 mL/kg の用量にて皮下投与した。投与後 1、3、6 時間に眼窩採血を行って補正血中イオン化カルシウム濃度を経時的に測定した。投与前及び投与後の補正イオン化カルシウム濃度の経時変化を平均値±標準誤差で図 5 (a) に示す。

その結果、イオン化カルシウム濃度の最大値はどれも同程度であり、hPTH
20 (1-34) と PEG-PTH の血中濃度推移 (図 4) および AUC (表 4) の違いに比べて大きな違いがなく、従って、PEG を結合させることによって血中カルシウム濃度が急激に上昇することはないと考えられた。

詳細にイオン化カルシウム濃度の推移をみると、緩衝液投与群のイオン化カルシウム濃度は徐々に低下したが、hPTH (1-34) は全ての用量で投与後 1 時間に
25 最大の血中イオン化カルシウム濃度上昇を示し、その後低下した。2k PEG-PTH (1-34) も投与後 1 時間で最大の血中イオン化カルシウム濃度上昇を示し、3 時間まで持続してその後低下した。2k PEG-PTH (1-34) と hPTH (1-34) を比較した場合、150 nmol/kg の 2k PEG-PTH (1-34) は、500 nmol/kg の hPTH (1-34) とほぼ同程度のイオン化カルシウム濃度上昇を示した。一方、150

nmol/kg の 5k PEG-PTH (1-34) の血中イオン化カルシウム濃度の変化は、hPTH (1-34) や 2k PEG-PTH (1-34) と異なり、投与後徐々に上昇して3時間で hPTH (1-34) と同程度の最大値を示し、その後持続する傾向が認められた。

5 週齢の雌DDYマウス（日本チャールス・リバー株式会社）についても同様の実験を行った。緩衝液、並びに 500、150 及び 50 nmol/kg の hPTH (1-34) は一群 6 匹ずつ、150 nmol/kg の 5k PEG-PTH (1-34) は 3 匹に、各薬剤 5 mL/kg の用量にて皮下投与した。投与後 1、3、6 時間に眼窩採血を行って補正血中イオン化カルシウム濃度を経時的に測定した。投与前及び投与後の補正イオン化カルシウム濃度の経時変化を平均値±標準誤差で図 5 (b) に示す。

10 緩衝液投与群のイオン化カルシウム濃度は徐々に低下したが、hPTH (1-34) は全ての用量で投与後3時間に最大の血中イオン化カルシウム上昇を示し、その後低下した。一方、150 nmol/kg の 5k PEG-PTH (1-34) の血中イオン化カルシウム濃度の変化は、投与後徐々に上昇して3時間で 500 nmol/kg の hPTH (1-34) と同程度の最大値を示し、その後持続する傾向が認められた。

15

(2) PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)

正常マウスにおける PEG-PTH (1-35) の血中カルシウム濃度上昇作用の有無について、以下の方法で検討した。hPTH (1-34) を、25 mmol/L リン酸-クエン酸緩衝液/100 mmol/L NaCl/0.05% Tween 80 溶液 (pH 5.0) を用いて希釈し、100、30、10 nmol/mL に調製した。2k、5k 及び 20k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) も同様に 30、10、2 nmol/mL (PTH相当量) に調製し、投与直前まで氷冷放置した。

6 週齢の雌DDYマウス（日本S L C株式会社）を用いて上記(1)と同様にしてpH 7.4の時の補正イオン化カルシウム濃度を得た。緩衝液は一群5匹、500 nmol/kg の hPTH (1-34) は一群4匹、150 及び 50 nmol/kg の hPTH (1-34) は一群5匹ずつ、並びに 150 nmol/kg の 2k、5k 及び 20k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) は一群4匹ずつ、50 及び 10nmol/kg は一群5匹ずつに、各薬剤 5 mL/kg の用量にて皮下投与した。投与後 1、3、6、9、24 時間に眼窩採血を行って補正血中イオン化カルシウム濃度を経時的に測定した。投与前及び投与後24時間

までの補正血中イオン化カルシウム濃度を表5に示す。

緩衝液投与群のイオン化カルシウム濃度は経時的に若干の変動は認められたが、大きな変化は認められなかった。それに対し、hPTH (1-34) は投与後1時間で上昇し、投与後3時間で最大値を示し、その後低下した。2k 及び 5k PEG-
5 [Cys³⁵]-PTH (1-35) は、投与後3時間で最大の血中イオン化カルシウム濃度上昇を示し、6時間まで持続してその後低下した。20k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) は投与後3時間で高い値を示し、投与後9時間でも緩衝液投与群よりも明らかに高い値を示した。

また、投与から24時間後の血中イオン化カルシウム濃度を見ると、20k
10 PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) 投与群では、全ての用量で非常に高い血中イオン化カルシウム濃度を示しており、高カルシウム血症を呈していることが明らかとなった。

このように、5 kDa以下のPEGをPTHに結合させた場合、血中イオン化カルシウム濃度上昇作用は、hPTH (1-34) と比較して若干持続する傾向は認め
15 られるが、最大値はそれほど変わらないのに対して、20 kDaのPEGを結合させると、高カルシウム血症を呈することが明らかとなった。

表5 正常マウスにおける、hPTH (1-34)、並びに2k、5k及び20k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)投与による
血中イオン化カルシウム濃度の経時変化

血中iCa濃度	用量 (nmol/kg)	投与前 (mM)	1時間後 (mM)	3時間後 (mM)	6時間後 (mM)	9時間後 (mM)	24時間後 (mM)
緩衝液	0	1.29 ± 0.04	1.38 ± 0.03	1.37 ± 0.03	1.39 ± 0.04	1.32 ± 0.06	1.43 ± 0.01
hPTH (1-34)	500	1.34 ± 0.03	1.44 ± 0.04	1.46 ± 0.04	1.43 ± 0.01	1.27 ± 0.04	1.39 ± 0.02
	150	1.33 ± 0.03	1.46 ± 0.02	1.48 ± 0.03	1.36 ± 0.02	1.32 ± 0.04	1.36 ± 0.03
	50	1.31 ± 0.03	1.45 ± 0.03	1.43 ± 0.03	1.33 ± 0.02	1.27 ± 0.05	1.36 ± 0.02
2k PEG-[Cys ³⁵]-PTH (1-35)	150	1.32 ± 0.02	1.44 ± 0.02	1.47 ± 0.05	1.48 ± 0.05	1.26 ± 0.02	1.34 ± 0.03
	50	1.27 ± 0.03	1.41 ± 0.02	1.47 ± 0.03	1.47 ± 0.02	1.29 ± 0.05	1.34 ± 0.03
	10	1.30 ± 0.04	1.44 ± 0.03	1.48 ± 0.02	1.39 ± 0.02	1.32 ± 0.04	1.37 ± 0.02
5k PEG-[Cys ³⁵]-PTH (1-35)	150	1.30 ± 0.03	1.43 ± 0.04	1.49 ± 0.03	1.52 ± 0.05	1.35 ± 0.02	1.40 ± 0.05
	50	1.31 ± 0.03	1.43 ± 0.03	1.49 ± 0.04	1.48 ± 0.03	1.35 ± 0.06	1.36 ± 0.04
	10	1.30 ± 0.04	1.44 ± 0.02	1.50 ± 0.02	1.43 ± 0.02	1.28 ± 0.04	1.36 ± 0.03
20k PEG-[Cys ³⁵]-PTH (1-35)	150	1.30 ± 0.02	1.42 ± 0.02	1.54 ± 0.02	1.55 ± 0.03	1.43 ± 0.06	2.71 ± 0.19
	50	1.30 ± 0.04	1.44 ± 0.03	1.53 ± 0.02	1.51 ± 0.03	1.44 ± 0.06	2.44 ± 0.12
	10	1.27 ± 0.04	1.39 ± 0.03	1.51 ± 0.01	1.48 ± 0.05	1.43 ± 0.05	1.78 ± 0.09

実施例 5

PEG-PTH (1-34) の麻酔下ラットにおける血圧低下作用

- PEG-PTH (1-34) の副作用の有無を調べるため、麻酔下ラットにおける血圧低下作用を以下の方法で測定した。hPTH (1-34) (株式会社ペプチド研) は 25 mM リン酸-クエン酸緩衝液で 2.5 mg/mL に調製し、使用するまで -20℃ 以下にて冷凍保存した。試験当日に、2.5 mg/mL hPTH (1-34) を 25 mM リン酸-クエン酸緩衝液/100 mM NaCl/0.05% Tween 80 溶液 (pH 5.0) にて希釈し、50、25 及び 12.5 µg/mL に調製した。実施例 1 (2) で調製したモノメトキシ 5k PEG-PTH (1-34) も同様に 36.5、18.3 及び 9.1 µg/mL (PTH (1-34) 相当量) に調製した。調製後は氷冷にて保存し、投与約 30 分前に室温に戻した。
- 10 週齢の雌 SD ラット (日本チャールス・リバー株式会社) をペントバルビタール ナトリウム (アボットラボラトリーズ) の腹腔内投与 (50 mg/kg) により麻酔し、大腿動脈に血圧測定用カテーテルを、大腿静脈に維持麻酔用カテーテルを挿入した。維持麻酔はシリンジポンプ (テルモ株式会社) を使用し、生理食塩液 (大塚製薬株式会社) で溶解した粉末状のペントバルビタール ナトリウム (東京化成工業株式会社) を 22.5 mg/kg/hour の速度で持続投与することにより行った。なお、血圧測定用カテーテルには、生理食塩液にて 100 U/mL に希釈したヘパリンナトリウム (ノボ・ノルディスク A/S) を充填した。全身血圧は、血圧測定用カテーテルに装着した圧カトランスデューサー (日本光電工業株式会社) の信号を血圧用アンプ (日本光電工業株式会社) に入力して測定し、平均血圧を指標とした。心拍数は、全身血圧の出力を瞬時心拍計ユニット (日本光電工業株式会社) に入力して測定した。以上のパラメータは、熱ペン式レコーダー (グラフテック株式会社) 上に 5 mm/min の速度で連続的に記録した。手術終了後、試験物質投与用注射針を背部皮下に挿入し、各パラメータが安定した後、薬剤の投与を行った。各群 4 匹ずつのラットを使用し、hPTH (1-34) を 50、25 及び 12.5 µg/kg、5k PEG-PTH (1-34) を 36.5、18.3 及び 9.1 µg/kg の投与量で 1 mL/kg の用量にて皮下投与し、投与後 90 分まで血圧をモニターした。投与後 20 分までの血圧の経時変化の代表例を図 6 に示す。上から陰性対照物質 (緩衝液)、50 µg/kg の hPTH (1-34)、36.5 µg/kg の 5k PEG-PTH (1-34) をそれぞれ

投与した場合の血圧変化を示す。また、PTH投与前の平均血圧値と投与後最大血圧低下を示した値を計測し、平均血圧値と最大血圧低下値との差を求めた。結果を平均値±標準誤差として図7に示す。縦軸は最大血圧低下 (mmHg)、横軸はPTHの投与量であり、■は緩衝液、●はhPTH (1-34)、▲は5k PEG-PTH (1-34)を示す。

hPTH (1-34)は投与直後に強い血圧低下作用を示すのに対し、5k PEG-PTH (1-34)は投与後の血圧低下作用が緩やかであった(図7)。また、hPTH (1-34)は12.5 µg/kg から 50 µg/kg まで用量依存的に血圧低下作用を示すのに対し、5k PEG-PTH (1-34)の血圧低下作用は弱く、特に高投与量の場合、hPTH (1-34)と比較して非常に弱いことが示された(図7)。

実施例6

OVXラットにおける2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)の骨量増加作用

OVXラットにおける2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)の骨量増加作用を以下の方法で検討した。hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35)、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)を25 mmol/L リン酸-クエン酸緩衝液/100 mmol/L NaCl/0.05% Tween80 溶液 (pH 5.0)を用いて希釈し、hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35)は10 nmol/mLに、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)は120 nmol/mlに調製分注し、使用時まで-80℃に保存した。

7週齢のメスSD-IGSラット(日本チャールス・リバー株式会社)を用い、60匹のラットには両側卵巢摘出術(OVX)を、7匹のラットには偽手術を施した。2週間後に卵巢摘出群の体重を測定し、1群6匹で各群の個体の平均体重が均等になるようにラットを振り分けた。

hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35)、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)を緩衝液で希釈し、hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35)はそれぞれ10、2.5及び0.625 nmol/mLに、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35)は120、30及び7.5 nmol/mLになるように調製した。

次に、偽手術群7匹には緩衝液を投与し、卵巢摘出群については各群6匹に、緩衝液、hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35) (10、2.5及び0.625 nmol/kg)、

2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) (120、30 及び 7.5 nmol/kg) をそれぞれ投与した。投与用量は 1 ml/kg とし、週 5 回 4 週間、皮下投与を行った。投与最終日にラットを代謝ケージに収容し、24 時間蓄尿を採取するとともに、投与最終日翌日、麻酔下放血によりラットを安楽死させた後、剖検を行い、血液、腰椎および大腿骨を採取した。尿および血液はチューブにとり、遠心分離により上清を採取し、パラメーター測定まで -20℃ に保存した。腰椎および右大腿骨は 70% エタノール中に保存した。腰椎（第二から第五腰椎）の平均骨密度及び右大腿骨の骨密度を二重 X 線骨塩量測定装置（DCS-600EX、アロカ）を用いて測定した。

hPTH (1-34)、[Cys³⁵]-hPTH (1-35) 及び 2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) の、腰椎の平均骨密度増加作用を図 8 (a) に、右大腿骨骨密度増加作用を図 8 (b) に示す。

卵巣摘出群は、腰椎及び大腿骨において偽手術群に対して有意な骨密度減少を示した。しかしながら、hPTH (1-34) 及び [Cys³⁵]-hPTH (1-35) 投与により、腰椎及び大腿骨において用量依存的に骨密度が増加し、腰椎では 2.5 nmol/kg 及び 10 nmol/kg で有意な骨量増加作用を示した。

一方、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) 投与でも、腰椎及び大腿骨において用量依存的な骨密度増加を示し、腰椎及び大腿骨共に 7.5 nmol/kg、30 nmol/kg 及び 120 nmol/g の全ての用量で有意な骨密度増加となった。このように、2k PEG-[Cys³⁵]-PTH (1-35) は *in vivo* でも骨量増加作用を保持していることが示された。

20

産業上の利用の可能性

PTH又はPTH誘導体にPEGを結合させることにより、バイオアベイラビリティを高めるだけでなく、副作用も顕著に軽減させるPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を容易に得ることができる。したがって、本発明のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体は、患者の負担を軽減させるPTH製剤として有用である。

25

請求の範囲

1. ポリエチレングリコール（PEG）を結合させたPEG結合副甲状腺ホルモン（PTH）又はPEG結合PTH誘導体。
- 5 2. 該PEGの分子量が1 kDa以上20 kDa未満である請求項1に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
3. 該PEGの分子量が1 kDa以上5 kDa以下である請求項2に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
4. 該PEGの分子量が2 kDa以上5 kDa以下である請求項3に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
- 10 5. 該PEGの分子量が2 kDaである請求項4に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
6. 該PEGが、1又は複数箇所結合している請求項1～5のいずれか1項に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
- 15 7. 該PEGが、1～4箇所結合している請求項6に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
8. 該PEGが、N末端以外の部位に結合している請求項6又は7に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
9. 該PEGが9位～C末端に結合している請求項8に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
- 20 10. 該PEGが11位～C末端に結合している請求項9に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
11. 該PEGが14位～C末端に結合している請求項10に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
- 25 12. 該PEGが20位～C末端に結合している請求項11に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
13. 該PEGが28位～C末端に結合している請求項12に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。
14. 該PEGがC末端に結合している請求項13に記載のPEG結合PTH

又はPEG結合PTH誘導体。

15. 該PEGが、PTH又はPTH誘導体に導入したPEG結合部位を介して結合している請求項6～14のいずれか1項に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。

5 16. 該PEG結合部位がシステイン残基である請求項15に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体。

17. 請求項1～16のいずれか1項に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を含有するPEG結合PTH組成物。

10 18. 薬効を保つのに有効な量の請求項1～16のいずれか1項に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体を有効成分として含有するPTH製剤。

19. PTH又はPTH誘導体にシステイン残基を導入した[Cys]-PTH誘導体。

20. 該システイン残基をN末端以外の部位に導入した請求項19に記載の[Cys]-PTH誘導体。

15 21. 該システイン残基を9位～C末端に導入した請求項20に記載の[Cys]-PTH誘導体。

22. 該システイン残基を11位～C末端に導入した請求項21に記載の[Cys]-PTH誘導体。

20 23. 該システイン残基を14位～C末端に導入した請求項22に記載の[Cys]-PTH誘導体。

24. 該システイン残基を20位～C末端に導入した請求項23に記載の[Cys]-PTH誘導体。

25. 該システイン残基を28位～C末端に導入した請求項24に記載の[Cys]-PTH誘導体。

25 26. 該システイン残基をC末端に導入した請求項25に記載の[Cys]-PTH誘導体。

27. [Cys³⁵]-PTH(1-35)である請求項26に記載の[Cys]-PTH誘導体。

28. PTH又はPTH誘導体中のアミノ基とPEG誘導体とを縮合させるか、

またはアミノ基にPEG誘導体を付加させることを包含する、請求項1～14のいずれか1項に記載のPEG結合PTH又はPEG結合PTH誘導体の製造方法。

29. PTH又はPTH誘導体に導入したPEG結合部位に、PEGを結合させることを包含する、請求項1～14のいずれか1項に記載のPEG結合PTH
- 5 又はPEG結合PTH誘導体の製造方法。
30. 該PEG結合部位がシステイン残基である請求項29に記載の製造方法。

図 1

(a)

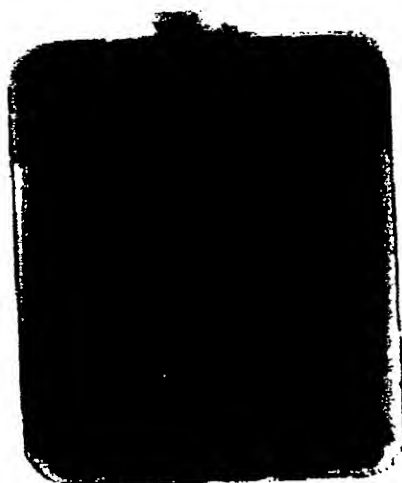


M P 1 2 3 4 P M

レーン

- M : 分子量マーカー
- P : 未反応 PTH
- 1 : mono-20k mPEG-PTH
- 2 : 20k mPEG-PTH 反応混合液
- 3 : mono-5k mPEG-PTH
- 4 : 5k mPEG-PTH 反応混合液

(b)



M P 5 6 7 8 P M

レーン

- M : 分子量マーカー
- P : 未反応 PTH
- 5 : 2k mPEG-PTH 反応混合液
- 6 : mono-2k mPEG-PTH
- 7 : mono,di-2k mPEG-PTH 混合画分
- 8 : di-2k mPEG-PTH

図 2



M P 1 2 3 4 M

レーン

- M : 分子量マーカー
- P : 未反応 PTH
- 1 : 5k mPEG-PTH 反応混合液
- 2 : mono-5k mPEG-PTH
- 3 : di-5k mPEG-PTH
- 4 : tri-5k mPEG-PTH

図 3

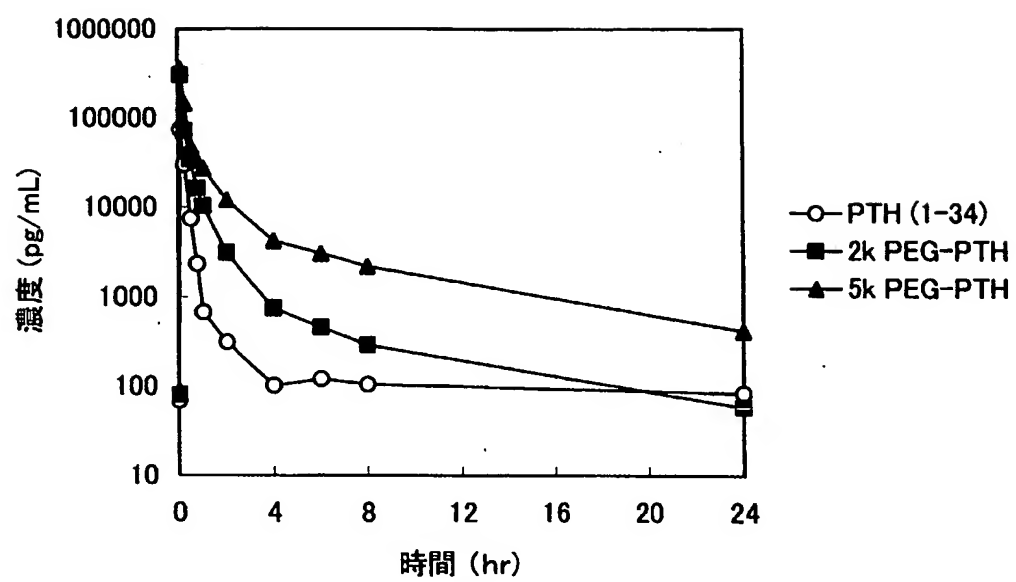


図 4

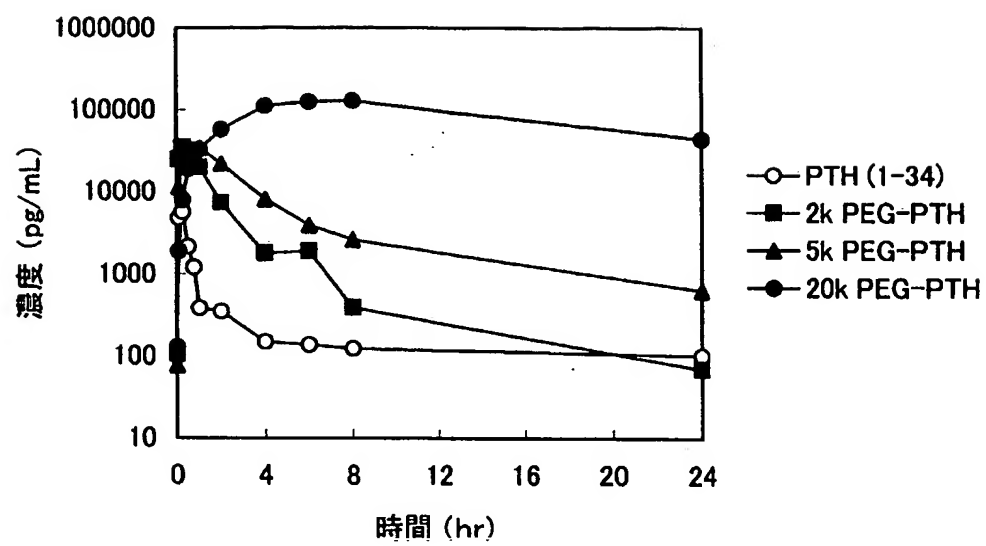
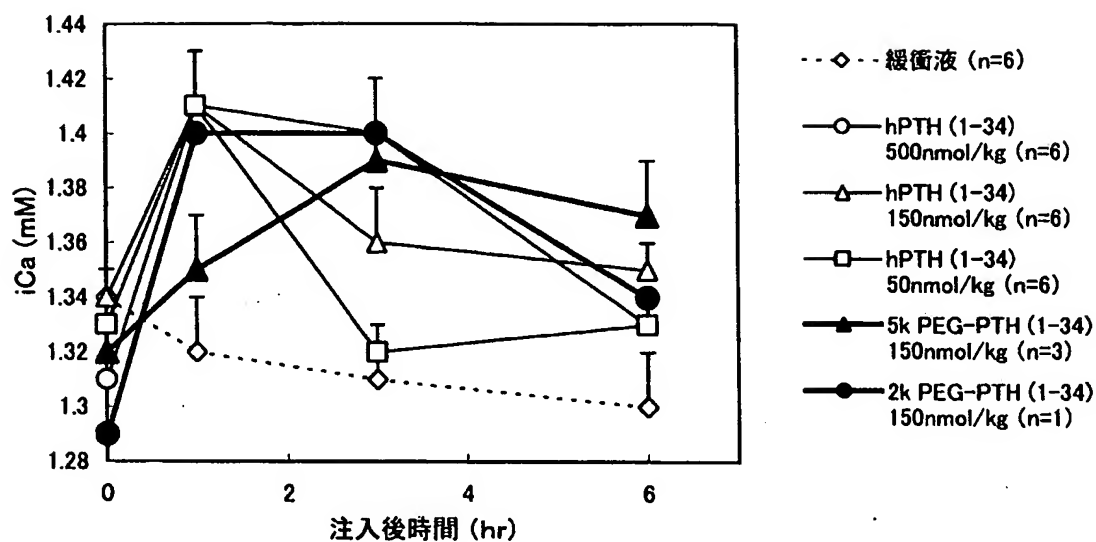


図 5

(a)



(b)

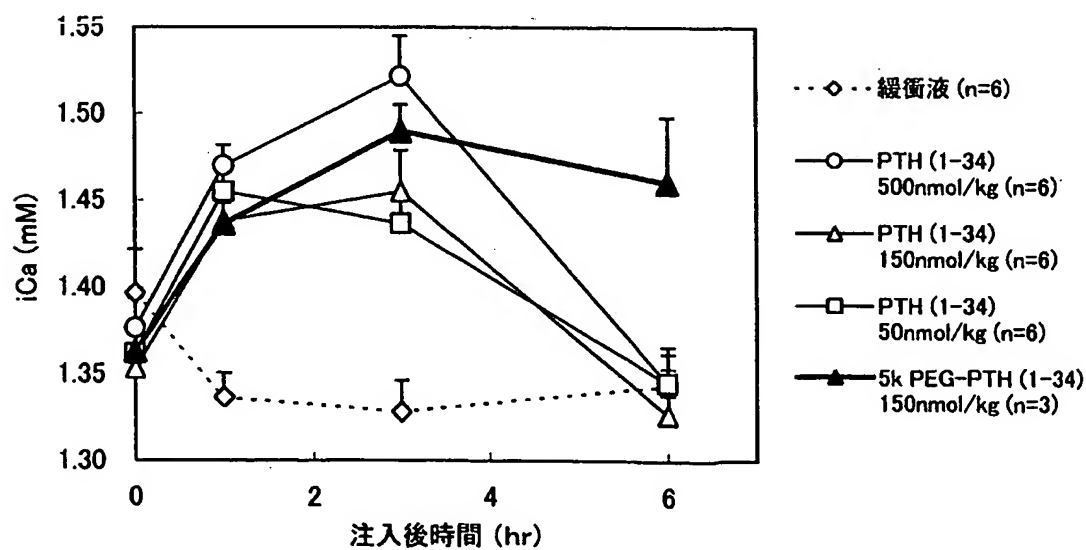


図 6

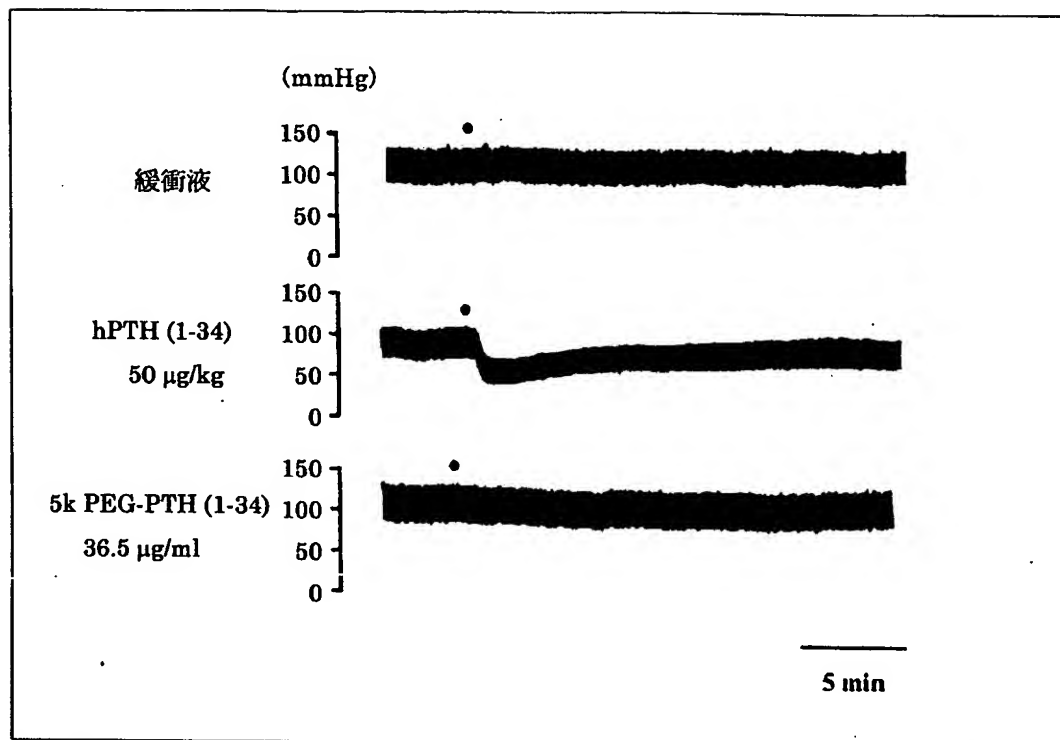


図 7

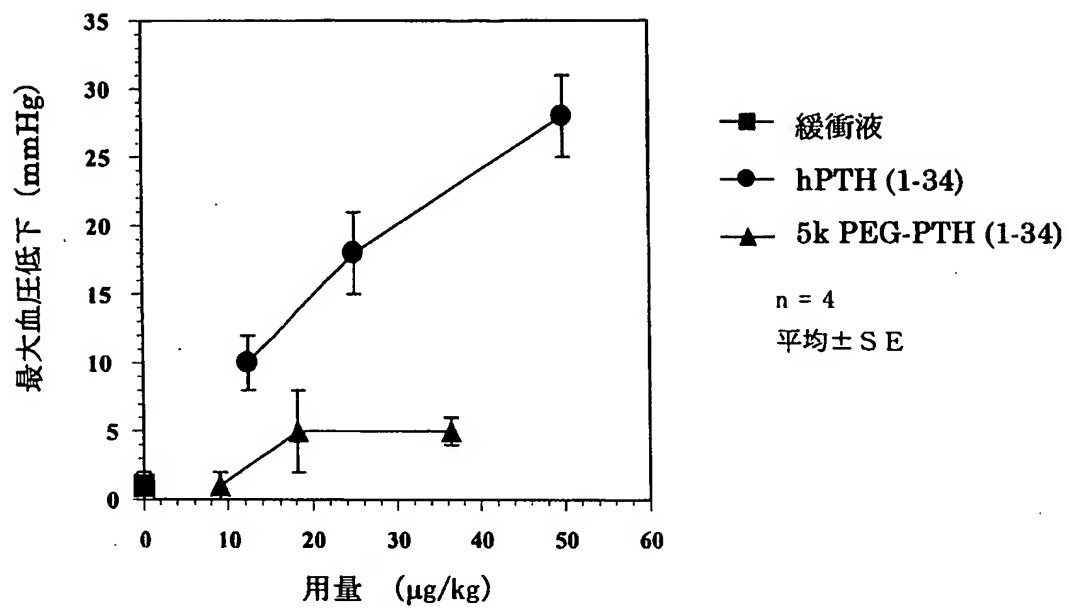
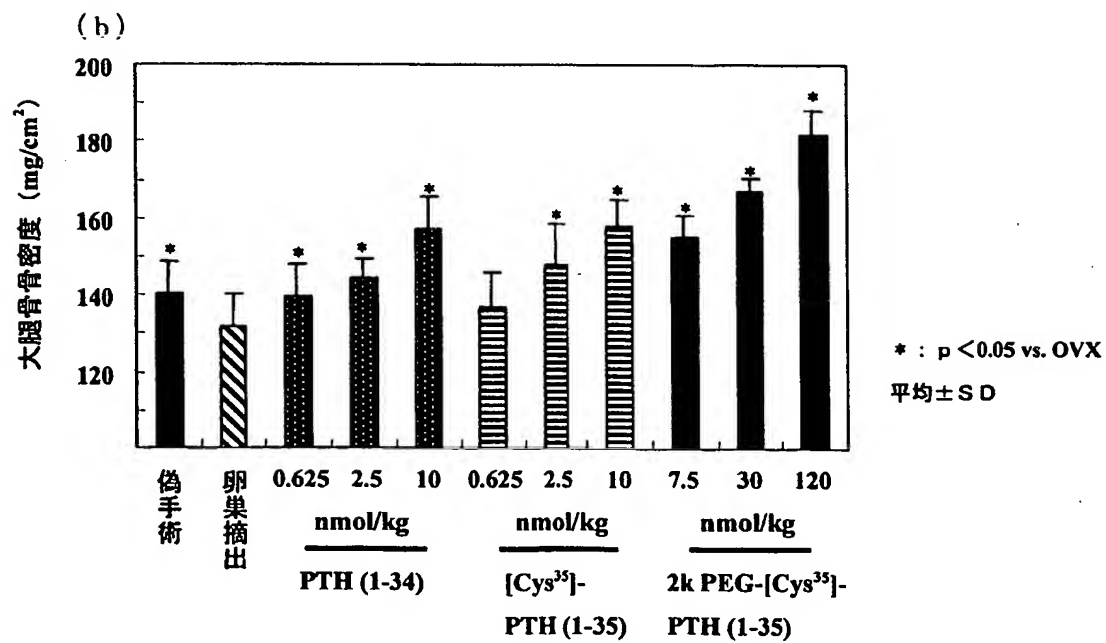
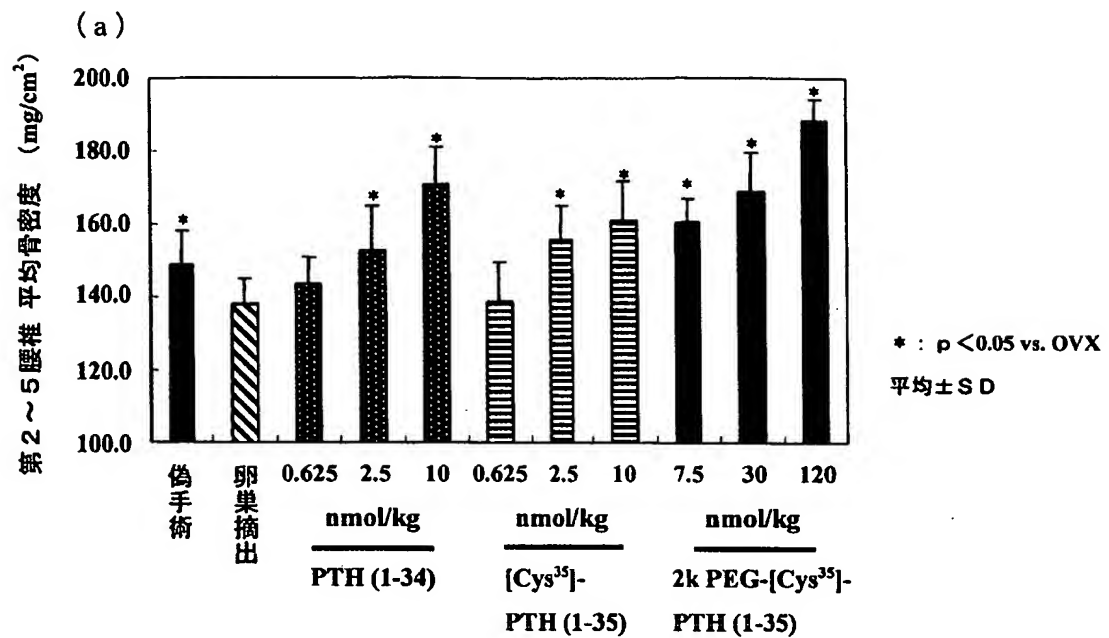


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K14/435, A61K38/22, 47/34, 47/48, A61P19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K14/435, A61K38/22, 47/34, 47/48, A61P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/81415 A2 (AMGEN INC.), 01 November, 2001 (01.11.01), & US 2003/0039654 A2	1-30
Y	JP 7-196925 A (ORTHO PHARMA CORP.), 01 August, 1995 (01.08.95), & FI 935485 A & KR 254650 A & NO 934477 A	1-30
Y	TSUTSUMI Y. et al., Chemical Modification of natural human tumor necrosis factor-alpha with polyethylene glycol increases its anti-tumor potency., Jpn.J. Cancer Res., 1994, Vol.85, No.1, pages 9 to 12	1-30
Y	WO 99/03887 A1 (BOLDER BIOTECHNOLOGY INC.), 28 January, 1999 (28.01.99), & JP 2001-510033 A & EP 1012184 A1	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 April, 2003 (24.04.03)	Date of mailing of the international search report 13 May, 2003 (13.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/435, A61K 38/22, 47/34, 47/48, A61P 19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/435, A61K 38/22, 47/34, 47/48, A61P 19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/81415 A2 (AMGEN INC) 2001.11.01 &US 2003/ 0039654 A2	1-30
Y	JP 7-196925 A (ORTHO PHARMA CORP) 1995.08.01 &FI 935485 A, &KR 254650 A, &NO 934477 A	1-30
Y	Tsutsumi Y, et al., Chemical modification of natural human tumor necrosis factor-alpha with polyethylene glycol increases its anti-tumor potency., Jpn J Cancer Res, 1994, vol.85, no.1, p.9-12	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.04.03

国際調査報告の発送日

13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/03887 A1 (BOLDER BIOTECHNOLOGY INC) 1999.01.28 &JP 2001-510033 A, &EP 1012184 A1	1-30

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.